

⑫

**DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

⑰ Numéro de dépôt: **85400564.2**

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>: **A 61 K 35/72**

⑱ Date de dépôt: **22.03.85**

⑬ Date de publication de la demande: **01.10.86**  
**Bulletin 86/40**

⑦ Demandeur: **Laboratoires BIOCDEX, 19 rue Barbès,  
F-92126 Montrouge Cédex (FR)**

⑧ Inventeur: **Gayral, Philippe, 52 avenue de la République,  
F-94800 Villejuif (FR)**  
Inventeur: **Hublot, Bernard, 22 rue du Champ de Mars,  
F-75007 Paris (FR)**

⑭ Etats contractants désignés: **AT BE CH DE FR GB IT LI  
LU NL SE**

④ Mandataire: **Moncheny, Michel et al, c/o Cabinet  
Lavoix 2 Place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris  
Cedex 09 (FR)**

⑤ **Utilisation de levures saccharomyces pour la fabrication d'un médicament contre l'amibiase.**

⑦ L'invention a pour objet l'utilisation de levures du genre *Saccharomyces*, en particulier *Saccharomyces bou-lardii* pour la fabrication d'un médicament contre l'amibiase.

**EP 0 195 870 A1**

UTILISATION DE LEVURES SACCHAROMYCES POUR LA FABRICATION  
D'UN MEDICAMENT CONTRE L'AMIBIASE

---

La présente invention concerne un médicament contre l'amibiase à base de levures du genre Saccharomyces.

5 L'amibiase est une affection parasitaire et contagieuse due à un protozoaire, Entamoeba histolytica ou amibe dysentérique. On l'observe dans le monde entier, mais surtout dans les régions chaudes et humides, en particulier dans les pays tropicaux qui repré-  
10 tent le domaine électif de l'endémie amibienne. Cependant l'amibiase n'est pas rare même en climat tempéré, notamment à cause des grands brassages actuels de populations.

La forme la plus courante de cette affection est l'amibiase intestinale qui s'exteriorise sous deux  
15 modes différents :

- la dysenterie amibienne, se manifestant par de violentes douleurs abdominales, des selles fréquentes faites de glaires et de sang, et ayant une tendance à la chronicité; et
- 20 - la colite amibienne chronique, plus habituelle en climat tempéré, se manifestant en particulier par une diarrhée chronique souvent alternée de constipation et de multiples

troubles (dyspepsie gastrique ou hépato-biliaire, manifestations neuro-végétatives, etc ..), et pouvant durer des années, même après disparition des amibes.

Les amibes peuvent aussi envahir le foie, et plus rarement le poumon, et donc une forme grave de la maladie est l'hépatite amibienne.

Le traitement de l'amibiase se fait essentiellement par des amoebicides qui sont pour la plupart des dérivés de la quinoléine ou de l'arsenic qui sont mal tolérés. Les nitroimidazoles très efficaces sur les amibiases tissulaires ont une action insuffisante sur les formes intestinales. De plus, la prophylaxie de l'amibiase est difficile car le déparasitage des personnes de l'entourage atteintes est peu efficace. Il serait donc intéressant de disposer d'un agent amoebicide peu nocif et pouvant être utilisé facilement.

Par ailleurs, on sait que des levures du genre Saccharomyces, telles que Saccharomyces boulardii et Saccharomyces cerevisiae sont utilisées depuis longtemps dans la prévention et le traitement des troubles du tractus gastro-intestinal, en particulier la diarrhée ou colite associée à la prise d'antibiotiques. Ces levures sont en général administrées par voie orale, sous forme de gélules contenant de 0,050 à 0,200 g de produit, les doses journalières étant habituellement entre 0,100 à 0,400 g pour l'adulte.

On a maintenant trouvé que les levures du genre Saccharomyces, en particulier Saccharomyces Boulardii, réduisent de manière significative l'incidence et la gravité de l'amibiase chez les rongeurs, notamment chez le raton, dont l'amibiase caecale est reconnue comme modèle expérimental de celle du colon de l'homme (WOOLFE G. Experimental Chemotherapy vol.1, édité par R.L. Schinitzer et F. Hawking, 1963, Acad. Press., p.422-443).

En conséquence, l'objet de l'invention est l'utilisation de levures du genre Saccharomyces pour la fabrication d'un médicament contre l'amibiase. De préférence, les levures utilisées sont maintenues vivantes par lyophilisation. Elles peuvent être administrées notamment à une dose journalière de 0,5 à 10 g (basée sur leur poids à l'état lyophilisé). Plus spécialement, les levures utilisées selon l'invention appartiennent à l'espèce Saccharomyces boulardii.

Les levures peuvent être administrées par voie orale, à des doses unitaires allant de 0,250 à 2,5 g, par exemple sous forme de gélules contenant environ 0,250g ou des sachets contenant de 0,250 à 2,5 g de levures. Mais bien entendu d'autres formes de présentation, telles que les suspensions et d'autres voies d'administration, peuvent être utilisées.

Les exemples suivants illustrent l'invention,

EXEMPLE PHARMACOLOGIQUE

a) Matériel biologique

1. Amibes : Entamoeba histolytica, souche  
5 Rahman, en culture mixte avec des bactéries procaryotes.  
Les amibes sont cultivés à 37°C sur milieu diphasique  
(solution de Ringer enrichie en sérum de cheval recouvrant  
une pente de sérum coagulé et des grains d'amidon de riz)  
et sont associés avec des bactéries, en particulier des  
10 Citrobacter sp.

Le pouvoir pathogène est vérifié tous les  
mois par l'essai de l'abcès amibien hépatique du Hamster  
(voir WOOLFE, ci-dessus). Les souches d'amibes sont  
systématiquement réisolées du foie et conservées en cul-  
15 ture pendant quelques mois. En cas de baisse d'activité,  
une nouvelle souche est utilisée, isolée plus récemment  
d'un foie de Hamster.

2. Levures : Saccharomyces boulardii  
lyophilisées, provenance : Laboratoires BIOCOTEX, (FRANCE).  
20 Les levures sont rehydratées dans du soluté de chlorure  
de sodium à 5% et activées par un choc thermique  
de 10 minutes à 25-30°C. Cette suspension contenant  
des levures vivantes est utilisée extemporanément.

Plusieurs préparations de Saccharomyces boulardii ont été comparées, levures vivantes, levures stérilisées par autoclavage et levures broyées, en choisissant une dose pour le traitement oral de 1,5 g/kg/jour.

5                   3. Rats "C D" (SPRAGUE-DAWLEY, Laboratoires Charles RIVER FRANCE). Les animaux utilisés sont des rats de 35 à 40 grammes, au sevrage, de l'un ou l'autre sexe. Ils sont nourris avec un lait en poudre courant, des pommes et ont de l'eau ad libitum. La veille de  
10 l'expérience, ils sont mis à la diète hydrique, après avoir reçu 0,1 ml/kg d'une solution saturée de sulfate de magnésium entraînant une certaine vacuité intestinale.

b) Inoculation des amibes :

Les rats sont anesthésiés par injection  
15 intrapéritonéale de 25 mg/kg de pentobarbital sodique. Après laparotomie, la caecum est dégagé, légèrement irrité par frottement, et on y injecte environ 500 000 trophozoïtes d'Entamoeba histolytica sous un volume de 0,5 ml environ. La plaie chirurgicale est suturée en  
20 deux plans musculaire et cutané .

Les rats récupèrent en 2 ou 3 heures et peuvent à nouveau être réunis dans des cages d'élevage où ils continuent à recevoir lait en poudre, pommes et eau. Environ 10% des animaux meurent des suites de  
25 l'inoculation dans les premières 24 heures.

c) Traitement des ratons amibiens :

La levure est toujours administrée à la posologie de 1,5 g/kg/jour, en suspension dans une solution de chlorure de sodium à 5 p 1 000 dans l'eau distillée; le traitement est effectué par canule gastrique en deux doses quotidiennes de 0,2 ml par raton à 10 heures et 18 heures. Les témoins ne reçoivent que la solution salée.

1. Essai curatif. Les ratons reçoivent les levures, dès le lendemain de l'inoculation des amibes : ce traitement dure quatre jours (J2 à J5) mais il a pu être raccourci en fonction des résultats. Ces essais sont réalisés comparativement avec les levures vivantes, stérilisées ou broyées lors d'un traitement de quatre jours.

2. Essai préventif : La levure est administrée un à trois jours avant l'inoculation.

d) Appréciation quantitative du degré d'infection :

Les animaux sont sacrifiés le 6ème jour (J6) par anesthésie prolongée (éther) et autopsiés à l'aveugle. Le caecum est dégagé, fendu longitudinalement, et examiné.

- 7 -

La gravité de l'atteinte amibienne est appréciée par un indice entre 0 et 5 directement inspiré de celui de WOOLFE mais en prenant plus en compte les facteurs de réaction tissulaire :

- 5                   - l'aspect du caecum : normal ou rétracté, et l'épaisseur de la paroi normalement fine;
- le contenu du caecum : normalement consistant et granuleux, en particulier la recherche de mucus à l'interface paroi-contenu;
- 10                   - la présence d'amibes : recherchées par examen microscopique direct du produit de raclage de la paroi caecale et dans le mucus et après culture.

On attribue à chaque animal, en fonction de son état pathologique un indice de gravité de 0 (indem-  
15 nes d'amibes) à 5 (gravement atteints).

Les résultats sont présentés par classes de gravité, ce qui permet de discuter de la répartition des rongeurs selon les traitements entre les différentes classes, par un test statistique du "chi-carré" :

- 20 - Indice 0 : Animaux indemnes d'amibes (guéris ou non infectés)
- Indice 1-2-3 : Animaux peu atteints.
- Indice 4-5 : Animaux gravement atteints.

e) Résultats

Les résultats des différentes expérimentations sont groupés par essai dans le tableau suivant.

TABLEAU

INDICES	levures vivantes 1er essai		Levures vivantes 2ème essai	
	TEMOINS	TRAITES	TEMOINS	TRAITES
0 (GUERIS)	1	6	1	10
1-2-3 (PEU ATTEINTS)	0	3	7	2
4-5 (TRES ATTEINTS)	8	1	5	1
TOTAL DES ANIMAUX	9	10	13	13
SIGNIFICATION STATISTIQUE	$\chi^2 = 12,01$ $p < 0,01$		$\chi^2 = 12,81$ $p < 0,01$	

Chez les rats ambiens témoins ne recevant que l'excipient, on relève un taux faible de guérison de 10% environ. Les témoins ont toujours des indices plus élevés, 4 ou 5, car ils associent un caecum rétracté à paroi épaissie, la présence de mucus et celle d'Entamoeba histolytica confirmée par la culture.

Dans les essais d'activité curative, l'effet du traitement est net à deux niveaux : augmentation du nombre d'animaux indemnes d'amibes et considérés comme guéris, et diminution du nombre d'animaux gravement atteints et d'indice élevé passant de 8 sur 9 chez les témoins à 1 sur 10 chez les traités.

Les études complémentaires ont montré que cet effet significatif de la levure se retrouve avec le produit autoclavé mais dans une moindre mesure; la levure broyée a une activité faible avec une diminution non significative du nombre de rats très atteints; la durée de traitement nécessaire à l'activité curative pour une posologie de 1,5 g/kg/jour est de 3 jours. Dans les essais d'activité préventive, l'essai sur 2 ou 3 jours montre un effet modéré de la levure.

D'autre part, aucune toxicité imputable aux trois produits administrés n'a été relevée, soit par mortalité des rongeurs soit lors des traitements.

Chez le raton, les levures Saccharomyces boulardii vivantes possèdent un indéniable effet sur les populations de trophozoïdes d'Entamoeba histolytica et sur la pathologie caecale qu'ils induisent. La lésion de la paroi caecale étant reconnue proche de la lésion du colon de l'homme, les résultats de cette expérimentation pharmacologique nous paraissent conforter à priori l'utilisation des levures de Saccharomyces contre l'amibiase chez l'homme.

EXEMPLE DE FORMATION

Gélule contenant :

- cellules lyophilisées de Saccharomyces  
boulardii ..... 250 mg
- 5 - Stéarate de magnésium ..... 3 mg

REVENDEICATIONS

1. Utilisation de levures du genre Saccharomyces pour la fabrication d'un médicament contre l'amibiase.
2. Utilisation selon la revendication 1,  
5 caractérisée en ce que les levures sont maintenues vivantes par lyophilisation.
3. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que les levures appartiennent à l'espèce Saccharomyces boulardii.
- 10 4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 en vue de l'administration par la voie orale, caractérisée en ce que des doses unitaires contenant de 0,250 à 2,5 g de levures sont préparées.
- 15 5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que la dose unitaire est sous forme de gélule contenant environ 0,250 g de levures.
6. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que la dose unitaire est sous forme de sachets contenant environ 0,250 à 2,5 g de levures.



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
E	EP-A-0 149 579 (LABORATORIES BIOCOCODEX) * En entier *	1-6	A 61 K 35/72
X	--- BIOLOGICAL ABSTRACTS/RMM, vol. 20, no. 15647, Philadelphia, PA, US; S. AHMAD et al.: "Induction of protective immunity against experimental infection of entamoeba-histolytica", & IRCS. (INT. RES. COMM. SYST.) MED. SCI.-LIB. COMPEND. 1980, vol. 9, no. 8, p526 * Abrégé *	1-6	
X	--- BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 79, 1985, no. 59018, Philadelphia, PA, US; A. SHARMA et al.: "Immunization of guinea pigs against entamoeba histolytica using glucan as an adjuvant", & INT. J. IMMUNOPHARMACOL 6(5): 483-492, 1984 * Abrégé *	1-6	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
X	--- FR-M- 3 501 (SOCIETE ANONYME DES LABORATORIES ROBERT ET CARRIERE) * Page 7, résumé *	1-6	A 61 K
Y	--- GB-A- 930 107 (GIUSEPPE CARLO SIGURTA) * Page 3, lignes 30-75 *	1-6	
--- -/-			
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 27-11-1985	Examinateur REMPP G.L.E.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention. E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	



<b>DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
Y	BE-A- 652 331 (SANDOZ SA) * Pages 9-12 *	1-6	
	---		
A	FR-A-2 228 470 (OUDOT et al.)		
	---		
A	FR-A-2 096 887 (GRIFFON)		
	-----		
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 27-11-1985	Examinateur REMPP G.L.E.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	